

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07096

研究課題名（和文）プロスタグランジンD2の非アルコール性脂肪肝炎における役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of prostaglandin D2 in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

結城 幸一（Yuhki, Koh-ichi）

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80302420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）におけるプロスタグランジン（PG）D2の役割を解明するため、本研究ではPGD2の受容体であるDPが欠損したマウスとメラノコルチン4受容体（MC4R）が欠損したマウスを掛け合わせたMC4R/DPダブル欠損マウスを用い、高脂肪食と四塩化炭素による短期NASHモデルと、長期間高脂肪食を負荷する長期NASHモデルを施行し解析を行った。その結果、NASH発症時の肝線維化に対し、PGD2が線維化促進に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食の欧米化や生活習慣の変化により、日本人の肥満率は上昇し、メタボリックシンドローム（MetS）となる患者が増加している。非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、MetSの患者において肝臓で現れる病気の状態であり、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝疾患に類似した肝組織像を示す。NASHは、放置すると肝臓のダメージの指標である線維化が進行し、肝硬変、肝がんと病状が悪化していく。本邦においてもその患者数は増大しているが、効果的な治療薬はまだ存在しない。よってNASH発生メカニズムの解明は、学術的にも社会的にも意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of prostaglandin (PG) D2 in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), we performed a short-term NASH model with a high-fat diet and carbon tetrachloride and a long-term NASH model with a long-term high-fat diet, using MC4R/DP double-deficient mice that were a cross between mice lacking DP, a receptor for PGD2, and mice lacking melanocortin 4 receptor (MC4R). The results suggest that PGD2 may promote liver fibrosis during NASH.

研究分野：薬理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 プロスタノイド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝線維化は、B型・C型肝炎ウイルスの持続感染、アルコールの過剰摂取、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、自己免疫性肝炎、胆汁うっ滞、薬物、寄生虫など、様々な原因により引き起こされる。従来、肝線維化は不可逆的であると思われていたが、近年その一部は可逆的で治療可能である可能性が示され始めている。一方、肝線維化は、慢性肝疾患において肝硬変、肝がんに至る共通経路である。直接作用型抗ウイルス薬など、抗ウイルス療法の進歩により、ウイルス性肝炎を基に発症する肝がんは減少している。しかし、NASH においては未だ承認された薬物療法は存在しない。本邦において現在 NASH 患者は 200 万人以上と推定されているが、メタボリック症候群の患者増加により、今後ますます増加すると予想されており、今後 NASH に起因する肝がん患者の増加が危惧されている。よって、肝線維化病態形成に関与する因子の解明は、新規臨床応用の展開に資することが期待され非常に重要である。

NASH が肝硬変、肝がんへ病態進展することを阻止するには、肝臓の線維化をいかに抑制するかが重要となる。線維化を促進しているのは、コラーゲンなどの細胞外基質を過剰産生している活性化肝星細胞である。肝星細胞は、正常時には、ビタミン A を貯蔵している静止型肝星細胞の状態である。しかし、炎症時に傷害肝から放出される HMGB1 (High-mobility group box 1) などにより刺激されると、静止型肝星細胞は活性化型になり、さらに TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) の刺激により、コラーゲンなどの細胞外マトリックス産生を亢進し、傷害により脱落した肝実質細胞のスペースを埋める (線維化) 働きをする。その後、肝実質細胞が再生すると、不必要になった細胞外マトリックスは MMPs (matrix metalloproteinases) に分解され、肝臓は正常に戻る。しかし、NASH のような慢性炎症状態では、肝星細胞は活性化状態を維持し、コラーゲンだけでなくコラーゲン分解酵素であるコラゲナーゼの阻害物質 TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) をも産生し続け、結果、過剰な細胞外マトリックス蓄積状態 (線維化状態) が進行し、肝硬変、肝がんへと病態が悪化していく。

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG)  $D_2$ 、 $PGE_2$ 、 $PGF_2\alpha$ 、 $PGI_2$  とトロンボキサン  $A_2$  より成る生理活性脂質の総称である。各プロスタノイドは、それぞれに特異的な受容体を介して非常に多彩な作用を示す。NASH 患者において、プロスタノイド産生の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 の発現上昇が認められ、プロスタノイドが NASH 病態形成に関与していると想定された。我々は、プロスタノイド受容体欠損マウスとメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食負荷による NASH 病態モデルを用い、MCD 食負荷に伴う肝臓のプロスタノイド合成酵素・受容体発現変化を解析したところ、 $PGD_2$  の合成酵素および  $PGD_2$  受容体 DP の発現が亢進していることを見いだした。肝臓を構成している細胞の中で、DP が発現しているのは肝星細胞である。従来、 $PGD_2$  が星細胞の様々な機能に影響を与えるという報告がある。しかし、NASH 病態進展における  $PGD_2$ -DP 系の役割は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、NASH におけるプロスタグランジン (PG)  $D_2$  の役割解明であった。食の欧米化や生活習慣の変化により、日本人の肥満率は上昇し、メタボリックシンドローム (MetS) となる患者が増加している。非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、MetS の患者において肝臓で現れる病気の状態であり、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝疾患に類似した肝組織像を示す。NASH は、放置すると肝臓のダメージの指標である線維化が進行し、肝硬変、肝がんとなり病状が悪化していく。本邦においてもその患者数は増大しているが、効果的な治療薬はまだ存在しない。我々は、これまでの研究で、 $PGD_2$  の受容体である DP の mRNA 発現量が、本研究とは別の NASH モデルで上昇することを見いだしていた。そこで本研究では、よりヒトの NASH に近い病態を示すメラノコルチン 4 受容体 (MC4R) 欠損マウスに対する高脂肪食負荷により NASH を発症する動物モデルを用い、 $PGD_2$  の NASH 病態進展に対する役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) MC4R/DP 欠損マウスを用いた NASH モデル

MC4R 欠損マウスは、20 週間高脂肪食負荷を行うことにより NASH を発症する。本研究では、MC4R 及び MC4R/DP 欠損マウスに対し、20 週間、高脂肪食 (D12492、リサーチダイエツト社) あるいはウェスタンダイエツト (D12079B、リサーチダイエツト社) 負荷を行った。その後、血液や肝臓を採取し各種解析をおこなった。血液については、肝機能障害の指標としてトランスアミナーゼ (ALT) 値を測定し、内因性  $PGD_2$ -DP 系が欠損したことによる肝機能障害の進行度を解析した。さらに、肝組織染色のためにパラホルムアルデヒド固定した肝組織より切片を作製した。一方、肝組織より RNA を抽出・逆転写反応し、mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR (qPCR) により解析した。

#### (2) MC4R/DP 欠損マウスを用いた短期 NASH モデル

MC4R 及び MC4R/DP 欠損マウスに対し、高脂肪食負荷を 6 週間行い、その後、四塩化炭素を 0.2 ml/kg 腹腔内に単回投与した。このマウスは、四塩化炭素投与後さらに 10 日間高脂肪食負荷す

ることにより NASH を発症する。この NASH モデルを施行し、経時的に血液と肝臓を摘出して (1) と同様の解析を行った。

### (3) 培養肝星細胞における PGD<sub>2</sub> の役割

野生型マウスより肝星細胞を単離・培養した。活性化刺激としては、IL-1 $\beta$  と TGF- $\beta$  を用いた。また、1% 低酸素状態で細胞を培養し、プロスタノイド受容体発現変化を qPCR で解析した。

## 4. 研究成果

(1) MC4R 及び MC4R/DP 欠損マウスに 20 週間の高脂肪食負荷を行い、経時的にサンプリングしたところ、血中 ALT 値は、高脂肪食負荷 10 週で有意に高値を示したが、MC4R と MC4R/DP 欠損マウス間で差を認めなかった (図 1)。また、体重増加、肝重量/体重比についても両群間で差を認めなかった。さらにシリウスレッド染色により線維化の程度を解析した結果、高脂肪食負荷 20 週で、両群とも線維化を認めるもののその程度は低かった。次に高脂肪食をウェスタンダイエットに変えて解析を行った。まだサンプル数が少ないが、肝組織における mRNA 発現を qPCR で解析したところ、CTGF やタイプ I コラーゲン、タイプ III コラーゲンといった線維化関連因子の mRNA 発現は、MC4R と MC4R/DP 欠損マウス間で差を認めなかった。一方、シリウスレッド染色では、高脂肪食負荷の時よりも強い染色像が観察されたが、MC4R 欠損マウスと比較して MC4R/DP 欠損マウスの肝臓において線維化の程度がより強くなっていた。

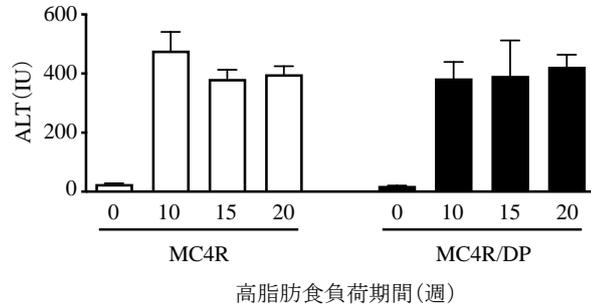


図1. 高脂肪食負荷による血中 ALT 量の変化

(2) 6 週間のウェスタンダイエットにより、MC4R および MC4R/DP 欠損マウスの血中 ALT は、いずれも約 20 IU から約 300 IU まで上昇したが、2 群間で有意な差は認められなかった。しかし、四塩化炭素投与 1 日後、両群とも著明な ALT 量の増加を認めたが、MC4R/DP 欠損マウスは、有意に MC4R 欠損マウスより低値を示した (図 2)。また、qPCR 解析の結果、ウェスタンダイエット 6 週負荷により、タイプ I コラーゲン mRNA の発現量は両群で上昇した。四塩化炭素投与後、MC4R 欠損マウス肝臓ではさらにタイプ I コラーゲン mRNA 発現が亢進したが、MC4R/DP 欠損マウスの肝臓では、有意に発現上昇が減弱していた (図 3)。さらに、シリウスレッド染色により線維化の程度を解析したところ、MC4R 欠損マウスと比較して MC4R/DP 欠損マウスの肝線維化は減弱していた。これらの結果は、PGD<sub>2</sub>-DP 系が、肝線維化に対し促進的に働いていることを示唆している。

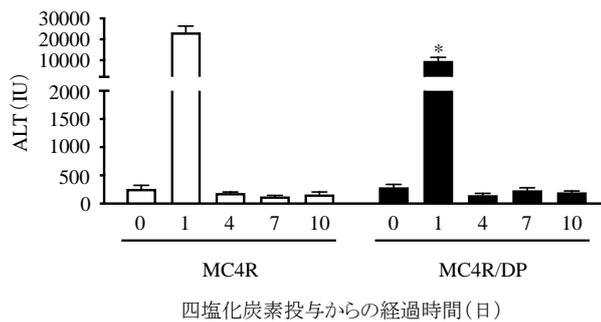


図2. 短期 NASH モデルにおける血中 ALT 量の変化

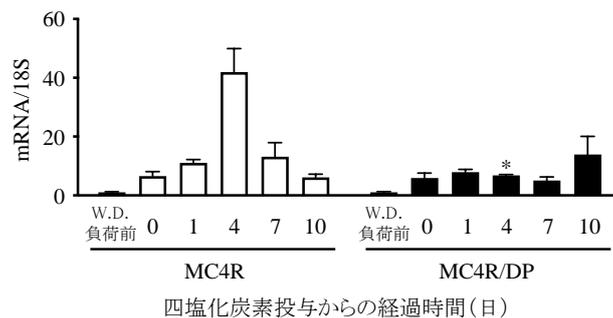


図3. 短期 NASH モデルにおけるタイプ I コラーゲン mRNA 発現変化

(3) これまでの研究では、DP は肝臓の中では肝星細胞にのみ発現しているとされている。実際、肝実質細胞やクッパー細胞に DP が発現していないことはこれまでに確認している。しかし、野生型マウスより肝星細胞を単離培養し、qPCR で DP mRNA の発現を解析すると、その発現は検出限界に近く、かつ安定しない。この肝星細胞を用い、IL-1 $\beta$  と TGF- $\beta$  で線維化刺激する際に DP アゴニストを添加し、線維化促進作用があるか解析した。結果、DP アゴニストを添加しても線維化関連遺伝子の発現変化は認められなかった。よって in vitro 細胞培養系での解析を行うためには、DP 受容体発現を上昇させる必要がある。この問題を解決するため、肝臓内の酸素濃度が低いことに着目し、単離培養した肝星細胞を低酸素状態で培養し、DP の発現が高くなるか解析した。低酸素状態で 1、4、7 日間培養後、RNA を抽出し qPCR で DP mRNA 発現を解析したが、いずれの場合も通常酸素培養の場合よりも高くなることはなく、低酸素では DP の発現を上昇させることはできなかった。これについては、さらなる条件検討が必要である。

本研究の結果、MC4R および MC4R/DP 欠損マウスを用いた短期 NASH モデルにおいて、内因性 PGD<sub>2</sub> の肝線維化促進作用の可能性が示され、DP アンタゴニストの NASH 治療薬としての可能性が示唆された。一方で、長期間ウェスタンダイエット負荷を行う NASH モデルでは、明確な PGD<sub>2</sub> の肝線維化促進作用は認められず、MC4R/DP 欠損マウスの肝臓で、逆に線維化が悪化している場合もあった。これらの結果は、PGD<sub>2</sub> が NASH 病態進展のステージによって、良性にも悪性にも働く可能性を示唆している。今後さらに個体数を増やして詳細な解析を行うことで、PGD<sub>2</sub> の NASH 病態進展における役割を明らかにし、NASH 治療薬開発へとつなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 結城幸一、大久保知子、中山恒、成宮周、牛首文隆
2. 発表標題 Roles of prostanoids in hepatic stellate cell function
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 結城幸一、平田朋浩、今道力敬、柏木仁、中山恒、成宮周、牛首文隆
2. 発表標題 マウス肝再生におけるプロスタグランジン I2 と TNF-alpha の役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今道 力敬  (Imamichi Yoshitaka)  (00570194)	旭川医科大学・医学部・助教    (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------